SNI

Standar Nasional Indonesia

SNI 01-2332.1-2006

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

Cara uji mikrobiologi - Bagian 1: Penentuan *coliform* dan *Escherichia coli* pada produk perikanan

ICS 67.120.30

Badan Standardisasi Nasional

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

© BSN 2006

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang menyalin atau menggandakan sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun dan dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Gd. Manggala Wanabakti
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.
Telp. +6221-5747043
Fax. +6221-5747045
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar isi

Daftar isi i
Prakata ii
1 Ruang lingkup 1
2 Istilah dan definisi 1
3 Prinsip 2
4 Peralatan 2
5 Media dan pereaksi 2
6 Kondisi pengujian 3
7 Preparasi contoh 3
8 Prosedur 3
9 Interpretasi hasil 5
10 Pelaporan 6
11 Keamanan dan keselamatan kerja (K3) 6
Lampiran A (informatif) Angka paling memungkinkan/APM dengan seri tabung pengenceran 7
Lampiran B (normatif) Indeks APM dengan tingkat kepercayaan 95% untuk berbagai kombinasi hasil positif dari 3 seri tabung pengenceran 9
Lampiran C (normatif) Indeks APM dengan tingkat kepercayaan 95% untuk berbagai kombinasi hasil positif dari 5 seri tabung pengenceran 10
Lampiran D (normatif) Pembuatan media 11
Lampiran E (normatif) Pembuatan pereaksi 14
Lampiran F (informatif) Skema penentuan coliform dan *Escherichia coli* 16
Bibliografi 17

Tabel 1 Berat contoh yang diambil yang akan diuji 3
Tabel 2 Interpretasi hasil 5
Tabel A.1 Cara pemilihan kombinasi seri tabung pengenceran APM dengan 5 seri tabung pengenceran 8
Tabel B.1 Indeks APM dengan tingkat kepercayaan 95% untuk berbagai kombinasi hasil positif dari 3 seri tabung pada pengenceran 10^{1}, 10^{2} dan 10^{3} 9
Tabel C.1 Indeks APM dengan tingkat kepercayaan 95% untuk berbagai kombinasi hasil positif dari 5 seri tabung pada pengenceran 10^{1}, 10^{2} dan 10^{3} 10

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

Prakata

Dalam rangka memberikan jaminan mutu dan keamanan pangan terhadap komoditas yang akan dipasarkan di dalam dan luar negeri, maka perlu disusun suatu Standar Nasional Indonesia (SNI) metode uji yang dapat memenuhi jaminan tersebut.

SNI 01-2332.1-2006 ini merupakan revisi dan mengganti SNI 01-2332-1991 *Standar Metode pengujian mikrobiologi-Produk perikanan penentuan Escherichia coli* yang dirumuskan oleh Panitia Teknis Perikanan melalui rapat-rapat teknis, rapat prakonsensus dan rapat konsensus nasional pada tanggal 18 Maret 2005 di Jakarta. Dihadiri oleh wakil-wakil produsen, konsumen, asosiasi, lembaga penelitian, perguruan tinggi dan instansi terkait sebagai upaya untuk meningkatkan jaminan mutu dan keamanan pangan.

Berkaitan dengan penyusunan Standar Nasional Indonesia ini, maka aturan-aturan yang dijadikan dasar atau pedoman adalah:

1 Peraturan Pemerintah No. 69 tahun 1999 tentang Label dan Iklan Pangan.
2 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No. KEP. 01/MEN/2002 tentang Sistem Manajemen Mutu Terpadu Hasil Perikanan.
3 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No. KEP. 06/MEN/2002 tentang Persyaratan dan Tata Cara Pemeriksaan Mutu Hasil Perikanan yang Masuk ke Wilayah Republik Indonesia.
4 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No. KEP. 21/MEN/2004 tentang Sistem Pengawasan dan Pengendalian Mutu Hasil Perikanan untuk Pasar Uni Eropa.

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

© BSN 2006

Cara uji mikrobiologi - Bagian 1: Penentuan *coliform* dan *Escherichia coli* pada produk perikanan

1 Ruang lingkup

Standar ini digunakan untuk menentukan bakteri indikator sanitasi (*Coliform* dan *Escherichia coli)* pada produk perikanan.

2 Istilah dan definisi

2.1
coliform
kelompok bakteri yang digunakan sebagai indikator adanya polusi kotoran dan kondisi sanitasi yang tidak baik

2.2
faecal coliform
kelompok bakteri fakultatif aerob, gram negatif tidak membentuk spora, berbentuk batang pendek, mampu memfermentasi laktosa dengan menghasilkan gas serta tumbuh pada suhu $45^0C \pm 0,5^oC$ selama sekurang-kurangnya 24 jam

2.3
E. coli
bakteri gram negatif yang berbentuk batang pendek atau *coccus*, tidak membentuk spora

2.4
inkubasi
pengkondisian mikroorganisme untuk tumbuh dan berkembang biak sesuai dengan suhu dan waktu yang diperlukan

2.5
kekerangan
semua jenis (*spesies*) dari kekerangan antara lain, *Oyster* (*Pinctada* sp), kepah (*Meritrix meritrix*), tiram (*Crassotrea cuculata*), simping (*Common minolowpen*), remis dan kijing baik yang hidup ataupun telah terlepas dari kulitnya, segar atau beku, utuh atau berupa bagian

2.6
media
nutrisi dalam bentuk padat atau cair untuk tempat pertumbuhan mikroorganisme

2.7
metode angka paling memungkinkan /APM
metode untuk menghitung jumlah mikroba dengan menggunakan medium cair dalam tabung reaksi, pada umumnya setiap pengenceran 3 seri atau 5 seri tabung dan perhitungan yang dilakukan merupakan tahapan pendekatan secara statistik

2.8
mikroorganisma
kelompok organisma yang berukuran kecil dan hanya dapat dilihat di bawah mikroskop

© BSN 2006

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

2.9
produk perikanan
ikan termasuk biota perairan lainnya yang ditangani dan/atau diolah untuk dijadikan produk akhir, umumnya berupa ikan segar, ikan beku dan olahan lainnya yang digunakan untuk konsumsi manusia

2.10
koloni terduga *(suspected colonies)*
koloni-koloni pada media agar selektif yang memberikan ciri-ciri *Escherichia coli* yang khas. Koloni ini harus dikonfirmasi untuk meyakinkan benar tidaknya *Escherichia coli*

3 Prinsip

Menumbuhkan bakteri dalam suatu media cair dan perhitungan dilakukan berdasarkan jumlah tabung yang positif setelah diinkubasi pada suhu dan waktu tertentu.

4 Peralatan

a) *waterbath* bertutup dengan sirkulasi 45°C ± 0,5°C;
b) inkubator 35°C ± 1°C;
c) *blender* beserta jar yang dapat disterilisasi atau *stomacher*;
d) botol pengencer;
e) tabung *durham*;
f) cawan petri ukuran 15 mm x 90 mm;
g) tabung reaksi ukuran 16 mm x 150 mm dan 13 mm x 100 mm;
h) timbangan dengan ketelitian 0,0001 g;
i) mikroskop;
j) pipet atau *pippetor* 1ml, 5 ml dan 10 ml.

5 Media dan pereaksi

a) *Brilliant Green Lactose Bile* (BGLB), 2 % *Broth* (D.1);
b) *Lauryl Tryptose Broth* (LTB) (D.2);
c) EC *Broth* (D.3);
d) *Levine's Eosin Methylen Blue* (L-EMB) agar (D.4);
e) *Tryptone* (*Tryptophane*) *Broth* (TB) (D.5);
f) MR-VP *Broth* (D.6);
g) *Simmon Citrate Agar* (D. 7);
h) *Plate Count Agar* (D.8);
i) Larutan *Butterfield's Phosphate Buffered* (E.1);
j) Pereaksi *Kovacs* (E.2);
k) Pereaksi VP (E.3);
l) Indikator MR (E.4);
m) Pereaksi pewarnaan gram (E.5).

CATATAN Pembuatan media diuraikan dalam Lampiran D dan pembuatan pereaksi diuraikan dalam Lampiran E

© BSN 2006

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

6 Kondisi pengujian

Pengujian contoh kekerangan menggunakan 5 seri tabung pengencer sedangkan untuk produk perikanan lainnya menggunakan 3 seri tabung pengencer.

7 Preparasi contoh

Dengan menerapkan teknik aseptis, contoh diambil secara acak dan dipotong kecil-kecil hingga berat masing-masing contoh yang akan diuji sesuai ketentuan pada Tabel 1. Contoh beku dilelehkan pada saat akan dianalisa dan pelelehan dilakukan selama 18 jam pada suhu sekitar 2ºC– 5ºC atau suhu di bawah 45ºC dan tidak lebih dari 15 menit.

Tabel 1 Berat contoh yang diambil yang akan diuji

Berat contoh	Berat contoh yang akan diuji
< 1 kg atau 1 l	100 g atau 100 ml
1 kg atau 1 l - 4,5 kg atau 4,5 l	300 g atau 300 ml
> 4,5 kg atau 4,5 l	500 g atau 500 ml

8 Prosedur

8 .1 Persiapan contoh

a) Untuk contoh dengan berat lebih kecil atau sama dengan 1 kg atau 1 l sampai dengan 4,5 kg atau 4,5 l timbang contoh padat sebanyak 25 g atau contoh cair sebanyak 25 ml dari contoh yang akan diuji , kemudian masukkan dalam wadah atau plastik steril dan tambahkan 225 ml larutan *Butterfield's Phosphate Buffered*

b) Untuk contoh dengan berat lebih besar dari 4,5 kg atau 4,5 l timbang contoh padat sebanyak 50 g atau contoh cair sebanyak 50 ml , kemudian masukkan dalam wadah atau plastik sterildan tambahkan 450 ml larutan *Butterfield's Phosphate Buffered*,

c) Homogenkan selama 2 menit. *Homogenat* ini merupakan larutan dengan pengenceran $10^{1.}$

8.2 Tahap analisa

8.2.1 Uji pendugaan *coliform (Presumptive coliform)*

a) Siapkan pengenceran 10^2 dengan cara melarutkan 1 ml larutan 10^1 ke dalam 9 ml larutan pengencer *Butterfield's Phosphate Buffered*. Lakukan pengenceran selanjutnya sesuai dengan pendugaan kepadatan populasi contoh. Pada setiap pengenceran dilakukan pengocokan minimal 25 kali.

b) Pindahkan dengan menggunakan pipet steril, sebanyak 1 ml larutan dari setiap pengenceran ke dalam 3 seri atau 5 seri tabung *lauryl tryptose Broth* (LTB) yang berisi tabung *durham*.

c) Inkubasi tabung-tabung tersebut selama 48 jam ± 2 jam pada suhu 35°C ± 1°C. Perhatikan gas yang terbentuk setelah inkubasi 24 jam dan inkubasikan kembali tabung-tabung negatif selama 24 jam. Tabung positif ditandai dengan kekeruhan dan gas dalam tabung *durham*.

© BSN 2006

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

d) Lakukan "Uji penegasan *coliform*" untuk tabung-tabung positif.

8.2.2 Uji penegasan *coliform (confirmed coliform)*

a) Inokulasikan tabung-tabung LTB yang positif ke tabung-tabung BGLB *Broth* yang berisi tabung *durham* dengan menggunakan jarum *ose*,. Inkubasi BGLB *Broth* yang telah diinokulasi selama 48 jam ± 2 jam pada suhu 35°C ±1°C.

b) Periksa tabung-tabung BGLB yang menghasilkan gas selama 48 jam ± 2 jam pada suhu 35°C ±1°C. Tabung positif ditandai dengan kekeruhan dan gas dalam tabung *durham*.

c) Tentukan nilai angka paling memungkinkan (APM) berdasarkan jumlah tabung-tabung BGLB yang positif dengan menggunakan Angka Paling Memungkinkan (APM). Nyatakan nilainya sebagai "APM/g *coliform*"

8.2.3 Uji pendugaan *Escherichia coli (faecal coliform, presumptive Escherichia coli)*

a) Inokulasikan dari setiap tabung LTB yang positif ke tabung-tabung EC *Broth* yang berisi tabung *durham* dengan menggunakan jarum *ose*,. Inkubasi EC *Broth* dalam *waterbath* sirkulasi selama 48 jam ± 2 jam pada suhu 45°C ± 0,5°C. *Waterbath* harus dalam keadaan bersih, air di dalamnya harus lebih tinggi dari tinggi cairan yang ada dalam tabung yang akan diinkubasi.

b) Periksa tabung-tabung EC *Broth* yang menghasilkan gas selama 24 jam ± 2 jam, jika negatif inkubasikan kembali sampai 48 jam ± 2 jam. Tabung positif ditandai dengan kekeruhan dan gas dalam tabung *durham*.

c) Tentukan nilai angka paling memungkinkan (APM) berdasarkan jumlah tabung-tabung EC yang positif dengan menggunakan Angka Paling Memungkinkan (APM). Nyatakan nilainya sebagai "APM/g *faecal coliform*".

8.2.4 Uji penegasan *Escherichia coli (confirmed Escherichia coli)*

a) Dari tabung-tabung EC *Broth* yang positif dengan menggunakan jarum *ose* gores ke LEMB agar. Inkubasi selama 24 jam ± 2 jam pada suhu 35°C ± 1°C.

b) Koloni *Escherichia coli* terduga memberikan ciri yang khas *(typical)* yaitu hitam pada bagian tengah dengan atau tanpa hijau metalik.

c) Ambil lebih dari satu koloni (*typical*) *Escherichia coli* dari masing-masing cawan LEMB dan goreskan ke media PCA miring dengan menggunakan jarum tanam. Inkubasi selama 24 jam ± 2 jam pada suhu 35°C± 1°C.

d) Jika koloni yang khas (*typical*) tidak ada, pindahkan 1 atau lebih koloni yang tidak khas (*typical*) *Escherichia coli* ke media PCA miring.

8.2.5 Uji morfologi

Lakukan uji morfologi dengan melakukan pewarnaan gram dari setiap koloni *Escherichia coli* terduga. Biakan diambil dari PCA yang telah diinkubasi selama 24 jam (butir 8.2.4b). Dengan menggunakan mikroskop, bakteri *Escherichia coli* termasuk bakteri gram negatif, berbentuk batang pendek atau *coccus*.

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

8.2.6 Uji biokimia

8.2.6.1 Produksi *indol* (I)

Inokulasikan 1 *ose* dari PCA miring (butir 8.2.4b) ke dalam *tryptone Broth* inkubasi selama 24 jam ± 2 jam pada suhu 35°C ±1°C. Uji *Indol* dilakukan dengan menambahkan 0,2 ml – 0,3 ml pereaksi *Kovacs*. Reaksi positif jika terbentuk cincin merah pada lapisan bagian atas media dan negatif bila terbentuk cincin warna kuning.

8.2.6.2 Uji *voges proskauer* (VP)

Inokulasikan 1 *ose* dari PCA miring ke dalam MRVP *Broth*. Inkubasi selama 48 jam ± 2 jam pada suhu 35°C±1°C. Pindahkan sebanyak 1 ml dari setiap MRVP *Broth* yang tumbuh ke tabung reaksi ukuran 13 mm x 100 mm steril dan tambahkan 0,6 ml larutan *alpha naphtol* dan 0,2 ml 40 % KOH, kocok, tambahkan sedikit kristal kreatin untuk mempercepat reaksi. Kocok kembali dan diamkan selama 2 jam. Reaksi positif jika terbentuk warna merah muda *eosin* sampai merah mirah delima *(ruby)*.

8.2.6.3 Uji *methyl red* (MR)

Inkubasikan kembali MRVP *Broth* di atas (butir 8.2.6.2) selama 48 jam ± 2 jam pada suhu 35°C±1°C. Tambahkan 5 tetes indikator *Methyl red* pada setiap MRVP *Broth*. Reaksi positif jika terbentuk warna merah dan negatif jika terbentuk warna kuning.

8.2.6.4 Uji sitrat (C)

Goreskan 1 *ose* dari PCA miring (butir 8.2.4b) ke permukaan simmon *citrat* agar. Inkubasi selama 96 jam ± 2 jam pada suhu 35°C ± 1°C. Reaksi positif jika terjadi pertumbuhan dan media berubah warna menjadi biru, reaksi negatif jika tidak ada pertumbuhan dan media tetap hijau.

8.2.7 Produksi gas dari laktosa

Inokulasikan 1 *ose* dari PCA miring (butir 8.2.4b) kedalam LTB. Inkubasi selama 48 jam ± 2 jam pada suhu 35°C ± 1°C reaksi positif jika menghasilkan gas pada tabung durham.

9 Interpretasi hasil

Tabel 2 Interpretasi hasil

Kriteria	Biotipe 1	Biotipe 2
Gas pada tabung LTB	+	+
Indol	+	-
MR	+	+
VP	-	-
Citrat	-	-
Uji Morfologi	Gram negatif, bentuk batang pendek tidak berspora	Gram negatif, bentuk batang pendek tidak berspora

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

10 Pelaporan

Berdasarkan interpretasi hasil di atas (pasal 9), nyatakan *coliform* dan *Escherichia coli* dalam APM/g dengan menggunakan Angka Paling Memungkinkan (APM). Apabila pengujian menggunakan 3 seri tabung pengenceran gunakan tabel B.1 pada lampiran B dan apabila pengujian menggunakan 5 seri tabung pengenceran gunakan tabel C.1 pasal Lampiran C.

11 Keamanan dan keselamatan kerja (K3)

Untuk menjaga keamanan dan keselamatan kerja selama melakukan analisa maka perlu diperhatikan hal-hal sebagai berikut:

a) Cuci tangan sebelum dan sesudah melakukan analisa;
b) Gunakan jas lab selama melakukan analisa;
c) Bersihkan meja kerja sebelum dan sesudah melakukan analisa;
d) Bersihkan segera contoh yang tercecer dan mengandung bakteri dengan menggunakan bahan desinfektan;
e) Media yang sudah digunakan disterilkan terlebih dahulu sebelum dibuang.

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

© BSN 2006

Lampiran A
(informatif)

Angka paling memungkinkan/APM dengan seri tabung pengenceran

A.1 Latar belakang

Metoda untuk menduga jumlah bakteri dalam suatu produk, dapat menggunakan metoda hitungan mikroskopis, metoda hitungan cawan dan penentuan angka paling memungkinkan (APM). Organisme yang mati maupun hidup dapat dihitung dengan metoda hitungan mikroskopis, akan tetapi pada APM hanya organisma hidup yang dapat dihitung.

Metoda APM adalah metoda untuk menghitung jumlah mikroba dengan menggunakan medium cair dalam tabung reaksi yang pada umumnya setiap pengenceran menggunakan 3 atau 5 seri tabung dan perhitungan yang dilakukan merupakan tahap pendekatan secara statisitik. Tabung positif ditunjukkan oleh adanya pertumbuhan bakteri dan gas. Nilai APM ini diperoleh dengan anggapan sebagai berikut :

a) Bakteri dalam contoh menyebar secara random;
b) Bakteri dalam contoh tidak berkelompok atau cluster, tetapi saling terpisah;
c) Organisma yang terdapat dalam contoh dapat tumbuh dalam medium selama inkubasi;
d) Kondisi yang sesuai untuk pertumbuhan, seperti media dan waktu inkubasi.

Di dalam penggunaan seri tabung pengenceran tingkat pengenceran yang diperlukan didasarkan pada pendugaan populasi bakteri yang ada dalam contoh. Hasil yang baik adalah jika pada pengenceran yang lebih rendah contoh yang diduga lebih banyak menunjukkan hasil uji positif (adanya pertumbuhan bakteri) dan pada pengenceran lebih tinggi contoh yang diduga lebih sedikit menunjukkan hasil uji negatif (tidak ada pertumbuhan bakteri). Oleh karena itu jumlah populasi bakteri yang ada dalam contoh diduga tinggi maka contoh harus diencerkan sampai diperoleh tingkat pengenceran yang lebih tinggi sehingga nilai APM maksimum yang dapat dihitung. Metoda pengenceran yang paling mudah adalah dengan melakukan pengenceran 10 kali lipat dengan menggunakan 3 atau 5 seri tabung pengenceran.

Metoda APM digunakan untuk menduga organisma dalam jumlah sedikit (kurang dari 100/g) terutama susu, air dan makanan yang mempunyai partikel-partikel lain yang mungkin mengganggu keakurasian perhitungan. Kombinasi tabung-tabung positif yang diperoleh cukup untuk memberikan hasil yang signifikan dan umumnya terdapat dalam Tabel APM, sedangkan kombinasi yang tidak mungkin diabaikan. Tabel APM mempunyai tingkat kepercayaan 95 %. Jika kombinasi tabung-tabung positif yang diperoleh tidak termasuk dalam tabel APM maka contoh yang asli harus dilakukan pengujian kembali. Dan jika ini tidak dapat dilakukan, maka analis harus membandingkan dengan tabel APM yang lain untuk menghitung nilai APM berdasarkan hasil yang diperoleh.

A.2 Cara pemilihan kombinasi tabung positif pada 3 dan 5 seri tabung pengenceran dalam tabel APM

Penentuan APM dihitung berdasarkan jumlah seri tabung positif pada beberapa pengenceran yang digunakan yang didasarkan pada 3 atau 5 seri tabung pengenceran yang digunakan. Kombinasi yang diambil adalah 3 tingkat pengenceran dengan kaidah sebagai berikut:

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

Kasus 1 Seluruh tabung pada seri tabung pengenceran (10^{-1}, 10^{-2}, dst) menunjukkan reaksi positif

a) Pilih tingkat pengenceran tertinggi yang menghasilkan seluruh tabung positif dan 2 pengenceran berikutnya, seperti contoh a dan b (Tabel A).

b) Jika pada tingkat pengenceran yang lebih tinggi masih menghasilkan tabung positif (tingkat pengenceran 10^3 menghasilkan 1 tabung positif) maka tingkat pengenceran tersebut tingkat pengenceran tertinggi yang dipilih, seperti pada contoh c (Tabel A).

c) Jika pada tingkat pengenceran tertentu menghasilkan tabung negatif (tingkat) pengenceran 10^3) tetapi tingkat pengenceran berikutnya menghasilkan tabung positif (tingkat pengenceran 10^4 menghasilkan 1 tabung positif) maka yang dinyatakan tabung positif adalah tingkat pengenceran sebelumnya seperti pada contoh d (Tabel A).

d) Jika pada tingkat pengenceran tertinggi (10^4) masih terdapat tabung positif, maka pilih tingkat pengenceran sebelumnya seperti pada contoh e (Tabel A).

Kasus 2 Tidak ada satupun dari seri pengenceran yang menghasilkan seluruh tabung positif

a) Lihat pada contoh f (Tabel A), jika tingkat pengenceran tertentu menghasilkan tabung positif (10^2) maka pilih 2 tingkat pengenceran sebelumnya.

b) Jika pada pengenceran yang lebih tinggi masih menghasilkan tabung positif (pengenceran 10^3 menghasilkan 1 tabung positif) maka tambahkan tabung positif tersebut ke tingkat pengenceran sebelumnya seperti pada Tabel C (contoh g).

Tabel A.1 Cara pemilihan kombinasi seri tabung pengenceran APM dengan 5 seri tabung engenceran

Contoh	Tingkat pengenceran					Kombinasi tabung positif	APM/g
	10^0	10^1	10^2	10^3	10^4		
a	5	5	1	0	0	5-1-0	33
b	4	5	1	0	0	5-1-0	33
c	5	4	4	1	0	4-4-1	40
d	5	4	4	0	1	4-4-1	40
e	5	5	5	5	2	5-5-2	5400
f	0	0	1	0	0	0-0-1	0,18
g	4	4	1	1	0	4-4-2	4,7

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

© BSN 2006

Lampiran B
(normatif)

Indeks APM dengan tingkat kepercayaan 95% untuk berbagai kombinasi hasil positif dari 3 seri tabung pengenceran

Tabel B.1 Indeks APM dengan tingkat kepercayaan 95% untuk berbagai kombinasi hasil positif dari 3 seri tabung pada pengenceran 10^{1}, 10^{2} dan 10^{3}

Tab positif			APM/ g	Tk kepercayaan		Tab positif			APM/ g	Tk kepercayaan	
10^{1}	10^{2}	10^{3}		Bawah	Atas	10^{1}	10^{2}	10^{3}		Bawah	Atas
0	0	0	<3,0	-	9,5	2	2	0	21	4,5	42
0	0	1	3,0	0,15	9,6	2	2	1	28	8,7	94
0	1	0	3,0	0,15	11	2	2	2	35	8,7	94
0	1	1	6,1	1,2	18	2	3	0	29	8,7	94
0	2	0	6,2	1,2	18	2	3	1	36	8,7	94
0	3	0	9,4	3,6	38	3	0	0	23	4,6	94
1	0	0	3,6	0,17	18	3	0	1	38	8,7	110
1	0	1	7,2	1,3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3,6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7,4	1,3	20	3	1	1	74	17	200
1	1	1	11	3,6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3,6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4,5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4,5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9,2	1,4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3,6	42	3	2	3	290	90	1000
2	0	2	20	4,5	42	3	3	0	240	42	1000
2	1	0	15	3,7	42	3	3	1	460	90	2000
2	1	1	20	4,5	42	3	3	2	1100	180	4100
2	1	2	27	8,7	94	3	3	3	>1100	420	--

SUMBER : *Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual*. 8th edition, 1998

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

© BSN 2006

Lampiran C
(normatif)

Indeks APM dengan tingkat kepercayaan 95% untuk berbagai kombinasi hasil positif dari 5 seri tabung pengenceran

Tabel C.1 Indeks APM dengan tingkat kepercayaan 95% untuk berbagai kombinasi hasil positif dari 5 seri tabung pada pengenceran 10^{1}, 10^{2} dan 10^{3}

Tab positif			APM/g	Tk kepercayan		Tab positif			APM/g	Tk kepercayaan	
10^{1}	10^{2}	10^{3}		Bawah	Atas	10^{1}	10^{2}	10^{3}		Bawah	Atas
0	0	0	<2,0	-	6.8	3	3	2	24	9,8	70
0	0	1	1,8	0,09	6,8	3	4	0	21	6,8	40
0	1	0	1,8	0,09	6,9	3	4	1	24	9,8	70
0	1	1	3,6	0,7	10	3	5	0	25	9,8	70
0	2	0	3,7	0,7	10	4	0	0	13	4,1	35
0	2	1	5,5	1,8	15	4	0	1	17	5,9	36
0	3	0	5,6	1,8	15	4	0	2	21	6,8	40
1	0	0	2,0	0,1	10	4	0	3	25	9,8	70
1	0	1	4,0	0,7	10	4	1	0	17	6,0	40
1	0	2	6,0	1,8	15	4	1	1	21	6,8	42
1	1	0	4,0	0,7	12	4	1	2	26	9,8	70
1	1	1	6,1	1,8	15	4	1	3	31	10	70
1	1	2	8,1	3,4	22	4	2	0	22	6,8	50
1	2	0	6,1	1,8	15	4	2	1	26	9,8	70
1	2	1	8,2	3,4	22	4	2	2	32	10	70
1	3	0	8,3	3,4	22	4	2	3	38	14	100
1	3	1	10	3,5	22	4	3	1	27	9,9	70
1	4	0	11	3,5	22	4	3	2	33	10	70
2	0	0	4,5	0,79	15	4	3	2	39	14	100
2	0	1	6,8	1,8	15	4	4	0	34	14	100
2	0	2	9,1	3,4	22	4	4	1	40	14	100
2	1	0	6,8	1,8	17	4	4	2	47	15	120
2	1	1	9,2	3,4	22	4	5	0	41	14	100
2	1	2	12	4,1	26	4	5	1	48	15	120
2	2	0	9,3	3,4	22	5	0	0	23	6,8	70
2	2	1	12	4,1	26	5	0	1	31	10	70
2	2	2	14	5,9	36	5	0	2	43	14	100
2	3	0	12	4,1	26	5	0	3	58	22	150
2	3	1	14	5,9	36	5	1	0	33	10	100
2	4	0	15	5,9	36	5	1	1	46	14	120
3	0	0	7,8	2,1	22	5	1	2	63	22	150
3	0	1	11	3,5	23	5	1	3	84	34	220
3	0	2	13	5,6	35	5	2	0	49	15	150
3	1	0	11	3,5	26	5	2	1	70	22	170
3	1	1	14	5,6	36	5	2	2	94	34	230
3	1	2	17	6,0	36	5	2	3	120	36	250
3	2	0	14	5,7	36	5	2	4	150	58	400
3	2	1	17	6,8	40	5	3	0	79	22	250
3	2	2	20	6,8	40	5	3	1	110	34	250
3	3	0	17	6,8	40	5	3	2	140	52	400
3	3	1	21	6,8	40	5	3	3	180	70	400
5	3	4	210	70	400	5	5	0	240	70	710
5	4	0	130	36	400	5	5	1	350	100	1100
5	4	1	170	58	400	5	5	2	540	150	1700
5	4	2	220	70	440	5	5	3	920	220	2600
5	4	3	280	100	710	5	5	4	1600	400	4600
5	4	4	350	100	710	5	5	5	>1600	700	--
5	4	5	430	150	1100						

SUMBER : Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual. 8th edition, 1998

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

Lampiran D
(normatif)

Pembuatan media

D.1 *Brilliant green Lactose Bile Broth*

Peptone	10 g
Lactose	10 g
Oxgall	20 g
Brilliant green	0,0133 g
Aquades	1 liter

Larutkan *Peptone* dan *Lactose* dalam 500 ml *Aquades*. Tambahkan 20 gram *Oxgall* dalam 200 ml *Aquades*. Atur pH 7,0-7,5. Aduk dan tambahkan *Aquades* hingga 975 ml. Atur pH 7,4 tambahkan 13,3 ml 0,1 % *Brilliant green*. Tepatkan hingga 1 liter. Pipet ke dalam tabung-tabung yang berisi tabung *durham*. Sterilisasi selama 15 menit pada suhu 121°C. Media ini tersedia secara komersial.

D.2 *Lauryl Tryptose Broth*

Tryptose atau trypticase	20 g
Lactose	5 g
K_2HPO_4	2,75 g
$KH_2 PO_4$	5 g
NaCl	5 g
Sodium lauryl sulfate	0,1 g
Aquades	1 liter

Campur bahan bahan tersebut diatas dan pipet 9 ml ke dalam tabung ukuran 20 mm x 150 mm yang berisi tabung *durham* ukuran 10 mm x 75 mm. Sterilisasi selama 15 menit pada suhu 121°C, pH media 6,8 ± 0,2 . Media ini tersedia secara komersial.

D.3 EC *Broth*

Trypticase atau tryptose	20 g
Bile salt No.	31,5 g
Lactose	5 g
K_2HPO_4	4 g
$KH_2 PO_4$	1,5 g
Na Cl	5 g
Aquades	1 liter

Campur bahan-bahan tersebut diatas dan pipet 9 ml ke dalam tabung ukuran 20 mm x 150 mm yang berisi tabung *durham* ukuran 10 x 75 mm. Sterilisasi selama 15 menit pada suhu 121°C . Media ini tersedia secara komersial.

© BSN 2006

D.4 *Levine's Eosin Methylen Blue* (L-EMB) agar

Peptone	10 g
Lactose	10 g
$KH_2 PO_4$	2 g
Bacto agar	15 g
Eosin	0,4 g
Methylen blue	0,065 g
Aquades	1 liter

Aduk hingga larut *Peptone*, $KH_2 PO_4$ dan agar kedalam 1 liter *Aquades*. Ambil 100 ml atau 200 ml campuran tertsebut dan sterilisasi selama 15 menit pada suhu 121°C. Sebelum digunakan lelehkan masing-masing 100 ml dan tambahkan 5 ml larutan steril *Lactose* 20 % dan 2 ml larutan *eosin* 2 % serta 4,3 ml larutan methylene blue 0,15 %, didihkan kembali hingga 1 liter. Ambil 100 ml atau 200 ml dan sterilisasi selama 15 menit pada suhu 121°C. Media ini tersedia secara komersial.

D.5 *Tryptone Broth*, 1 %

Tryptone atau trypticase	10 g
Aquades	1 liter

Larutkan bahan tersebut dan pipet 5 ml ke dalam tabung ukuran 16 mm x 150 mm. Sterilisasi selama 15 menit pada suhu 121°C. Media ini tersedia secara komersial.

D.6 MRVP *Broth*

Medium 1

Buffered Peptone water powder	7 g
Glucose	5 g
$KH_2 PO_4$	5 g
Aquades	1 liter

Medium 2

Pancreatic digest casein	3,5 g
Peptic digest dari jaringan hewan	3,5 g
Dextrode	5 g
Potasium phosphate	5 g
Aquades	1 liter

Larutkan bahan-bahan tersebut dalam *Aquades*. Pipet 10 ml ke dalam tabung ukuran 16 mm x 150 mm. Sterilisasi selama 15 menit pada suhu 118°C -121°C. Media ini tersedia secara komersial.

D.7 *Simmons Citrate Agar*

Sodium Citrate	2 g
Na Cl	5 g
K_2HPO_4	1 g
$NH_4H_2PO_4$	1 g
Mg SO4	0,2 g
Bromthymol blue	0,08 g
Bacto agar	15 g
Aquades	1 liter

© BSN 2006

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

Aduk dan didihkan 1 menit-2 menit sampai seluruh agar larut. Pipet ke dalam tabung ukuran 16 mm x 150 mm. Sterilisasi selama 15 menit pada suhu 118°C-121°C. Sebelum beku miringkan tabung hingga memperoleh agar miring 4 cm - 5 cm dan agar tegak 2 cm - 3 cm. Media ini tersedia secara komersial.

D.8 *Plate Count Agar*

Tryptone	5 g
Yeast extract	22,5 g
Dextrose	1 g
Bacto agar	15 g
Aquades	1 liter

Panaskan seluruh bahan tersebut hingga mendidih. Sterilisasi selama 15 menit pada suhu 121° C. Media ini tersedia secara komersial.

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

© BSN 2006

Lampiran E
(normatif)

Pembuatan pereaksi

E.1 Larutan *Butterfield's Phosphate Buffered*

Larutan stok:

KH_2PO_4	34 g
Aqudes	500 ml

Atur pH 7.2 dengan 1 N NaOH. Tepatkan volume larutan tersebut hingga 1 liter dengan penambahan *Aquades*. Sterilisasi selama 15 menit pada suhu 121°C. Simpan dalam *refrigerator*.

Larutan kerja :
Pipet 10 ml larutan stok dan tepatkan hingga 1liter dengan penambahan *Aquades*. Sterilisasi selama 15 menit pada suhu 121°C.

E.2 Pereaksi *Kovacs*

p-Dimethylaminobenzaldehyde	5 g
Amyl alcohol	75 ml
H Cl (*concentrate*)	25 ml

Larutkan *p-Dimethylaminobenzaldehyde* dalam *amyl alcohol*. Pelan-pelan tambahkan HCl. Simpan pada suhu 4°C. Untuk uji *Indol* tambahkan 0,2 ml - 0,3 ml ke dalam kultur bakteri dalam *tryptone Broth*. Warna merah pada permukaan lapisan menunjukkan reaksi positif.

E.3 Pereaksi VP

Larutan 1

Alpha naphtol	5 g
Alcohol	100 ml

Larutan 2

KOH_4	0,1 g
Aquades	100 ml

Cara uji VP :
Pindahkan 1 ml kultur setelah inkubasi 48 jam dan tambahkan 0,6 ml **larutan 1** dan 0,2 ml **larutan 2**. Aduk, untuk mempercepat reaksi tambahkan sedikit kreatin. Simpan pada suhu ruang selama 4 jam. Reaksi positif jika terbentuk warna merah muda *eosin* sampai merah mirah delima (*ruby*).

E.4 Indikator *Methyl red*

Methyl red	0,1 g
Ethanol 95%	300 ml

Larutkan *Methyl red* dalam *Ethanol* dan tepatkan dengan *Aquades* hingga 500 ml

© BSN 2006

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

E.5 Pereaksi Pewarnaan Gram

Hucker's Crystal violet

Larutan A

Crystal violet	2 g
Ethyl alcohol, 95 %	20 ml

Larutan B

Ammonium oxalat	0,8 g
Aquades	80 ml

Campur larutan A dan B. Simpan selama 24 jam dan saring dengan kertas saring

Gram's *Iodine*

Iodine	1 g
Potassium Iodine	2 g
Aquades	300 ml

Masukkan KJ dalam *mortar*, tambahkan *Iodine* dan gerus dengan alat penggiling selama 5 detik -10 detik. Tambahakan 1 ml air dan gerus kemudian tambahkan 5 ml. Tambahkan lagi 10 ml dan gerus. Tuang larutan ini dalam botol pereaksi. Bilas *mortar* dan alat penggilingnya dan tambahkan air hingga volume 300 ml.

***Hucker's counterstain* (larutan stok)**

Safranin O	2,5 g
Ethanol, 95 %	100 ml

Larutan kerja : larutkan 10 ml larutan stok ke dalam 90 ml *Aquades*.

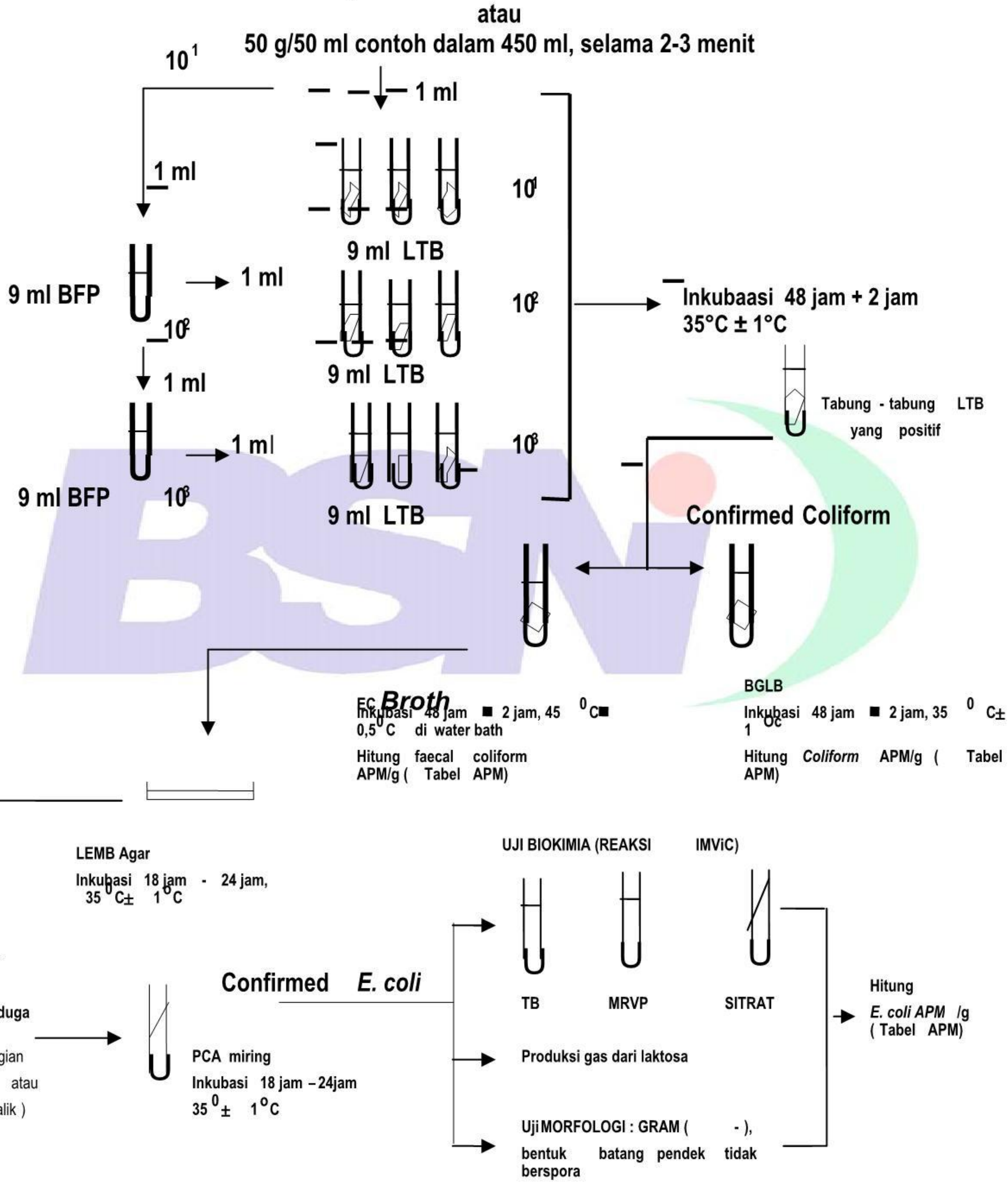
E. 6 Prosedur Pewarnaan Gram

Buat usapan bakteri yang akan diwarnai diatas gelas preparat. Usahakan usapan yang dibuat setipis mungkin. Fiksasi gelas preparat tersebut dengan melewatkan melalui api burner. Warna film selama 1 menit dengan larutan *Hucker's Crystal violet* dan cuci sebentar dengan air. Bubuhkan larutan gram *Iodine* selama 1 menit. Cuci dengan air mengalir. Lakukan dekolorisasi (penghilangan warna) dengan *Ethanol* 95 % hingga seluruh warna biru hilang (kira-kira 30 detik). Cuci kembali dengan air mengalir. Bubuhkan larutan *hucker's counterstain* (*safranin*) selama 1 menit dan cuci kembali dengan air mengalir, keringkan dan periksa di bawah mikroskop.

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

© BSN 2006

Lampiran F
(informatif)
Skema penentuan Coliform dan *Escherichia coli*



"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

© BSN 2006

Bibliografi

Association of Official Analytical Chemistry (AOAC), 2000, Official Methods of Analysis, 17th

Food and Drug Administration, Bacteriological Analytical Manual. 8th Edition, 1998.

Official Chemical Method, 1979. Fish Inspection Branch Fisheries And Ocean Canada.

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

© BSN 2006

“Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

© BSN 2006

“Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

© BSN 2006

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

BADAN STANDARDISASI NASIONAL - BSN
Gedung Manggala Wanabakti Blok IV Lt. 3-4
Jl. Jend. Gatot Subroto, Senayan Jakarta 10270
Telp: 021- 574 7043; Faks: 021- 5747045; e-mail : bsn@bsn.go.id

© BSN 2006